

원 저

**황연, 후박 및 구연산 혼합제제물에 의한
Streptococcus mutans의 증식 및 hydroxyapatite
비드 부착 억제효과**

유윤정 · 박용석^{***} · 광월아 · 윤준호^{*} · 민연숙^{*} · 권호근^{**} · 이승일
연세대학교 치과대학 구강생물학교실, 연세대학교 치과대학^{*}, 연세대학교
치과대학 예방치과학교실^{**}, 해태제과 식품연구소^{***}

색인: 황연, 후박 및 구연산 혼합제제물, Streptococcus mutans, 항균작용

I. 서 론

구강 악안면 영역에서 발생되는 질환중 치아우식증은 아직도 이환율이 높은 질병으로 인식되고 있다. 그동안 이를 예방하기 위한 노력의 일환으로 여러가지 형태의 예방법 및 치료방법이 개발되어 이의 발병율이 다소 감소하였다고는 하지만 (미국이나 서구 유럽의 경우), 우리나라의 경우 치아우식증이 아직도 어린이를 비롯한 성인 치과질환의 많은 부분을 차지하고 있다. 더욱이 치아우식증의 발생은 사람에 따라 서로 다르게 나타나기 때문에 치과영역에서 이 질환은 해결되어야 할 중요한 부분으로 간주되고 있다.

경조직 우식으로 발생하는 치아우식증은 파괴를 동반한 감염성 질환 (progressively infectious disease)으로, 치태내 세균, 음식물, 타액의 상호작용에 의하여 유발되는 다인성 질환으로서 치태내 세균 중에서도 Streptococcus mutans (S. mutans)가 주원 인균이며, S. mutans는 치면에 부착, 증식

및 산생성 과정을 거쳐 치아우식을 유발한다¹⁾. 즉, S. mutans는 치면의 획득 피막에 부착한 후 glucosyltransferase에 의하여 자당 (sucrose)으로부터 포도당 중합체 (glucose polymer)인 비수용성 mutan을 합성한다. 합성된 mutan은 치면에서 증식하는 세균간의 결합을 증가시키며, 이렇게 하여 치면에 부착한 S. mutans는 치면에 자리잡아 당대과정에서 산을 형성하여 법랑질을 탈회시켜 치아우식증을 유발한다^{2,3)}. 이와같이 치아우식증은 세균에 의한 감염성 질환이며, 여기에 섭취한 음식물의 종류, 그리고 시간에 의한 변수가 가세되어 이 질환의 진행 정도가 결정되지만, host factor로서 1) 치아 자체가 지니고 있는 탈회에 대한 저항력과, 2) 크고 작은 타액선으로부터 흘러나오는 타액이 치아우식증 진행을 예방하는 중요한 인자로 평가되고 있다. 이처럼 치아우식은 원천적으로 치아자체의 탈회에 대한 저항력이나 타액의 세정작용으로 발생 초기에 억제될 것으로 생각되나, 그럼에도 불구하고 치아우식증은 계속 증가추세에 있기 때

* 본 연구는 1994년도 연세대학교 학술 연구비 및 연세대학교 치과대학 학생연구비로 이루어 졌음.

* 연락처 : 유윤정. 우 120-752 서울시 서대문구 신촌동 134번지. 연세대학교 치과대학 구강생물학교실 전화 : 02-361-5093 전송 : 02-364-1085

문에 여러 가지 다른 요인들이 복합적으로 작용하는 다인자성 질환으로 생각하고 있다.

따라서 이런 치아우식증을 억제하기 위하여 여러 가지 방법이 이용되어 왔다. 치아우식을 예방하기 위한 가장 기본적인 것은 칫솔질을 하여 기계적으로 치태를 제거하는 방법이다. 그러나 칫솔질은 행동이 부자유한 소아나 신체 장애자에게 적용하기에는 어려운 점이 있으며, 치면의 열구 (groove)나 와 (sulcus)에 있는 세균을 제거하기에는 한계가 있으므로 부수적인 치아우식 예방법에 대해 관심을 갖게 되었고, 이외에도 불소처치법, 면역법, 항생제 투여법, 아니면 천연추출물을 이용하여 치아우식증을 억제하고자 하는 시도가 진행되고 있다. 이 중 불소요법은 현재까지 가장 널리 이용되고 있는 방법으로 불소가 탈회를 억제하고 재광화를 촉진하는 물질로 알려져 있을 뿐 아니라, 실제 항균효과도 있어, 치아우식증 예방에 좋은 면을 가지고 있는 것으로 생각된다. 하지만 불소를 사용하면 치아에 흰색 반점을 나타나게 하는 이른바 불소증 (dental fluorosis)이 발생된다는 역학 연구결과 때문에, 현재 사용되고 있는 불소의 농도에 대한 논란이 계속되고 있다⁴⁻⁷⁾. 불소요법 이외에 치아우식이 세균에 의한 질환이므로 원인균에 대한 예방접종을 실시하여 치아우식증을 예방하려는 시도가 진행되어 왔으며, 연구 결과 *S. mutans* 자체나 이 세균이 생성하는 glucosyltransferase를 동물에 접종시켰을 때 치아우식 발생율이 감소하는 것으로 나타나, 면역학적인 방법으로도 치아우식증을 예방할 수 있음이 입증되었다⁸⁻¹¹⁾. 그러나 *S. mutans*가 사람의 심장조직과 유사한 항원 구조를 가지고 있어, 이 균주에 대하여 형성된 항체가 사람의 심장조직에 결합하여 심장조직을 파괴시킬 가능성이 제시되어¹²⁻¹⁴⁾, 면역학적인 치아우식 예방법을 사람에게 적용하기 위해서는 정상조직과의 교차반응을 해결해야만 하는 또 다른 문제점이 대두될 수 있다. 이와 같이 불소이용법, 면역학적인 방법 이외에 항생제 투여법으로도 치아우식증을 예방할 수 있으나 사람에게 해를

주며 내성균주의 발현을 유도할 가능성이 있다.

이처럼 치아우식증을 예방할 수 있는 방법은 불소이용법, 면역학적 방법, 항생제 투여법 등 다양하다고 할 수 있으나, 치아 자체의 변색, 교차반응 및 내성균주 발현 등의 단점도 나타나고 있어, 이들을 좋은 방법으로 평가하기 힘들며 아직도 치아우식증을 확실하게 예방할 수 있는 방법이 제시되어 있지 못하고 있다. 그러므로 최근에는 부작용 없이 치아우식증을 해결할 수 있는 새로운 전략으로서 주변에서 쉽게 접할 수 있는 천연물에 관심을 갖고 이들로부터 항우식물질을 분리하고자하는 노력이 시도되고 있다¹⁵⁻²²⁾. 이에 본 연구 그룹에서도 부작용 없이 치아우식증을 예방할 수 있는 새로운 물질을 찾기 위하여 황연 및 후박으로부터 추출물을 분리하여 이들의 *S. mutans*에 대한 증식 억제효과를 한천원판 확산법으로 검정한바 황연(*Coptidis Rhizoma*) 및 후박 (*Magnoliae Cortex*) 추출물이 *S. mutans*에 대하여 항균작용이 있음을 발견하므로써 항우식제로서 이들 추출물의 사용 가능성에 대하여 관심을 갖게 되었다. 이에 본 실험에서는 황연 및 후박 추출물을 항우식물질로 식품에 사용할 수 있을지 가능성을 평가하기 위하여 1) 황연 및 후박 추출물이 여러 농도로 함유된 혼합제재물을 제조하였으며, 2) 이들 중 *S. mutans*에 대한 증식억제효과가 우수한 혼합제재물을 선택하여, 선택된 혼합제재물의 3) 접촉시간에 따른 *S. mutans*의 증식 억제효과 및 4) *S. mutans*의 치면부착 억제효과를 평가하였다.

II. 재료 및 방법

1. 연구재료

1.1 천연물

황연 및 후박은 경동시장의 한약재료상에서 구입한 후 냉장소에서 보관하여 사용하였다. 황연 및 후박 추출물은 천연물 100 g을 직경 0.5 - 1 cm로 세절한 후 50 % 에탄올 1000 ml를 용매로 하여 4 시간 씩 2 회 반복

하여 추출하였으며, 추출한 용액을 여과포에서 1 차 여과하여 여과액을 모았으며, 모은 여과액을 40 °C, 60 cmHg에서 용액의 양이 100 ml이 될 때 까지 감압 농축하였다. 농축액을 10 °C에서 8000 rpm으로 15 분간 원심분리한 후 상등액을 모아 실험에 사용하였다.

1.2 균주

S. mutans 균주는 한국과학기술원내 유전공학연구소에서 분양 받은 KCTC 3065 (ATCC 25175)를 Brain heart infusion (BHI) 액체배지에 배양하여 실험에 사용하였다.

2. 연구방법

2.1 천연 추출물에 의한 *S. mutans* 증식 억제효과

BHI 액체배지에서 15 - 18 시간 혐기적으로 배양한 후 배지로 희석하여 배양배지의 흡광도가 550 nm에서 0.07 O.D 값을 갖도록 한 *S. mutans* 균액 0.6 ml을 BHI 한천배지에 주입하고 균일하게 도말하였다. 균주가 도말된 BHI 한천배지 위에 직경이 8 mm인 원판을 놓은 후 추출물을 0.05 ml 씩 주입하여 37 °C에서 혐기적으로 15 - 18 시간 배양하였으며 추출물의 *S. mutans*에 대한 항균성은 원판 주변의 세균증식억제대 직경을 측정하여 판단하였다.

2.2 천연 추출물의 접촉시간에 따른 *S. mutans* 증식 억제효과

추출물 1 ml이 들어 있는 1.5 ml tube에 균수가 5×10^7 /ml 되게 *S. mutans*를 접종하여 추출물과 *S. mutans*를 10 분, 30 분, 60 분 및 120 분간 접촉시켰다. 그 후 반응액이 들어 있는 tube를 5 분간 원심분리하여 추출물이 함유된 상등액을 버리고 *S. mutans*만 남아 있는 tube에 BHI 액체배지 1 ml을 첨가한 후 37 °C에서 15 - 16 시간 혐기적으로 배양하여 *S. mutans*의 증식 정도를 평가하였다. *S. mutans*의 증식 정도는 550 nm에서 흡광도를 측정하여 평가하였다.

2.3 천연추출물이 *S. mutans*의 hydroxyapatite

(HA) bead 부착 억제에 미치는 효과 측정

상품화된 hydroxyapatite (치질의 구성성분) 비드를 사용하여 황연 및 후박 혼합제재물이 *S. mutans*의 치면부착에 미치는 영향을 정량적으로 분석하였다. 즉 동위원소로 표지화한 *S. mutans* 균액과 타액으로 도포한 HA 비드를 혼합한 용액에 항균물질을 첨가하여 항온기에서 1 시간 동안 반응시킨 후 HA 비드의 방사능을 측정하여 비드에 부착한 세균수를 계산하였다.

1) 부착에 사용하는 *S. mutans*의 방사능 표지 방사능으로 표지된 세균을 얻기 위하여 배양배지에 *S. mutans*를 접종하고 [³H]-thymidine (specific activity, 20 Ci/mmol)을 배양배지 1 ml 당 2 μCi되게 넣고 gas pack jar에서 24 시간 혐기적으로 배양하였다. 배양 후 4°C, 10,000 x g에서 10 분간 원심분리하여 동위원소로 표지화된 세균을 수집하고 30 ml 의 5 mM KCl과 1 mM CaCl₂를 함유하는 pH 6.0의 2 mM potassium phosphate buffer (이하 KCl 완충액으로 약칭함)로 세번 세정한 다음, KCl 완충액 100 μl당 세균수가 2×10^8 되게 현탁한 다음 이를 1 ml씩 나누어 -70°C에 보관하여 부착능 실험에 사용하였다.

2) 타액의 준비

타액은 20-30대 남자에게서 파라핀으로 자극하여 분비된 것을 얼음으로 냉각된 용기에 채취하여 혼합하였으며, 타액에 존재하는 이물질 및 세균을 제거하기 위하여 혼합한 타액을 원침 (12,000xg, 15 분)하여 상층액을 취한 후 타액내 분해효소를 불활성화하기 위하여 60°C에서 30 분간 가열하고 -20°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

3) 부착실험

HA 비드 30 mg을 증류수로 다섯번 세척하여 작은 입자들을 제거한 다음 37°C에서 건조시켰다. 이렇게 준비된 비드 30 mg을 1 ml의 타액으로 37°C에서 30 분간 처리하였다. 그리고 이 비드를 KCl 완충액으로 세 번 세

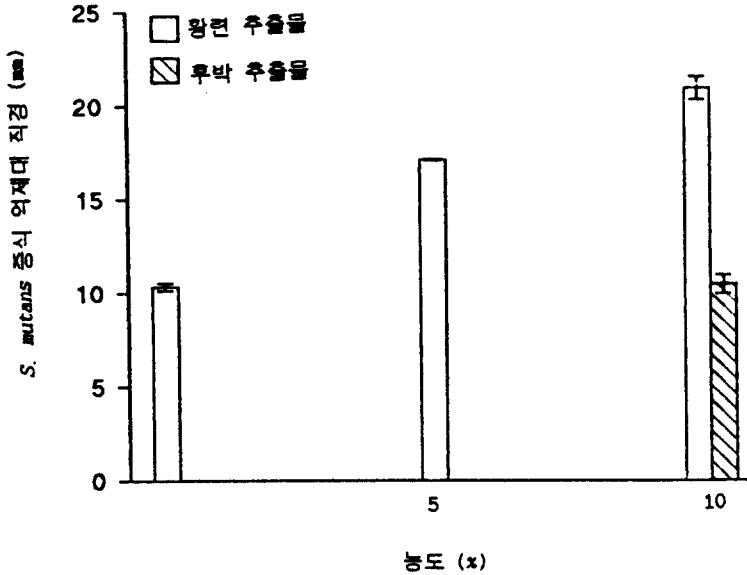


그림 1. 황연 및 후박 추출물의 농도에 따른 *S. mutans* 증식 억제효과. *S. mutans* 균액을 도말한 BHI 한천배지에 직경이 8 mm인 원판을 놓고 추출물 (1%, 5%, 10%)을 0.05 ml 씩 주입하여 37 °C 에서 혐기적으로 15 - 18 시간 배양하였다. 추출물의 *S. mutans*에 대한 항균성은 원판 주변의 세균증식억제대 직경을 측정하여 판단하였다.

정한 다음, 이것에 100 μl의 ³H-표지한 세균 (2×10⁸ cell)과 일정한 농도의 황연 및 후박 혼합제제물을 함유한 완충액을 넣고 회전 장치에 고정시키고 37°C에서 10 RPM의 속도로 1 시간 회전시켜 세균과 비드가 계속 혼합되도록 하였다. 이렇게 하여 세균부착반응을 유도한 후, 비드가 침전되게 하고 부착하지 않은 세균이 들어 있는 상층액을 제거하고 비드를 KCl 완충액으로 세번 세척하였다. 세척한 비드를 37 °C에서 하룻밤 건조시키고 scintillation vial에 옮긴 후 5 ml의 scintillation fluid에 넣고 liquid scintillation counter로 방사능 (cpm, counter per minute)을 측정하였다. 그리고 일정수의 수의 ³H-표지된 세균 100 μl의 방사능을 측정하여 표지능률 값 (2 × 10⁸/³H-표지된 2 × 10⁸ 세균의 방사능) 계산하였다. 그리고 측정된 cpm값은 표지능률 값으로 곱하여 HA 비드에 부착된 세균수를 산정하였다.

2.4 연구자료의 분석

본 실험에서 얻은 모두 결과는 비모수 검정법의 연속형인 맨 휘트니 검정 (Mann-Whitney U test)법으로 분석하였고, p 값 0.05이하를 통계적으로 유의한 수준으로 판정하였다.

III. 연구결과

1. 황연 및 후박 추출물의 농도별 *S. mutans* 증식 억제효과

황연 및 후박의 농도에 따른 *S. mutans*의 증식 억제효과를 원판확산법으로 측정된 결과 *S. mutans* 증식 억제대는 황연 추출물 1%, 5% 및 10% 농도에서 각각 10.3 ± 0.2 mm, 17.1 ± 0.1 mm, 21.0 ± 0.6 mm, 후박 추출물 1% 및 5% 농도에서는 세균증식억제대를 관찰할 수 없었으며 10% 농도에서는 10.4 ± 0.5 mm 로서 황연 추출물은 1% 에서 후박 추출물은 10%에서 *S. mutans*에 대한 증식 억제대를 나타내었다 (그림 1).

표 1. 황연, 후박, 구연산 및 축합인산염 혼합제재물 배합

천연 추출물	혼합제재물				
	1	2	3	4	5
황연	0 %	30 %	25 %	15 %	35 %
후박	40 %	40 %	25 %	70 %	35 %
구연산	20 %	30 %	25 %	15 %	15 %
축합인산염	40 %	0 %	25 %	0 %	15 %

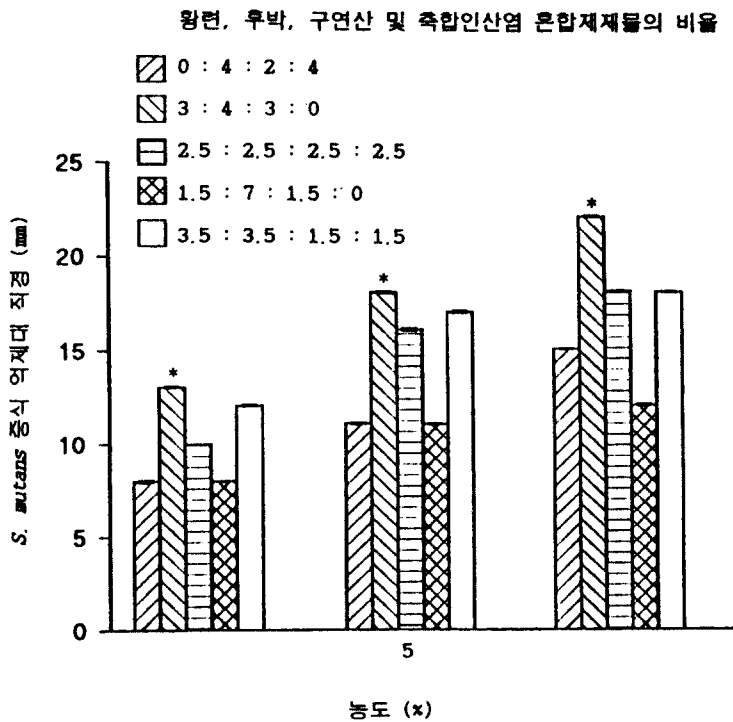


그림 2. 혼합제재물의 농도에 따른 *S. mutans* 증식 억제효과. *S. mutans* 균액을 도달한 BHI 한천배지에 직경 8 mm인 원판을 놓고 혼합제재물 (1 %, 5 %, 10 %)을 0.05 ml 씩 주입하여 37 °C 에서 혐기적으로 15 - 18 시간 배양하였다. 혼합제재물의 *S. mutans*에 대한 항균성은 원판 주변에 형성된 세균증식억제대의 직경을 측정하여 판단하였다. * 황연, 후박, 구연산 및 축합인산염의 혼합비율이 0: 4: 2: 4, 2.5: 2.5: 2.5: 2.5, 1.5: 7: 1.5: 0 및 3.5: 3.5: 1.5: 1.5인 혼합제재물로 처리한 결과와 비교하여 p < 0.05을 의미한다.

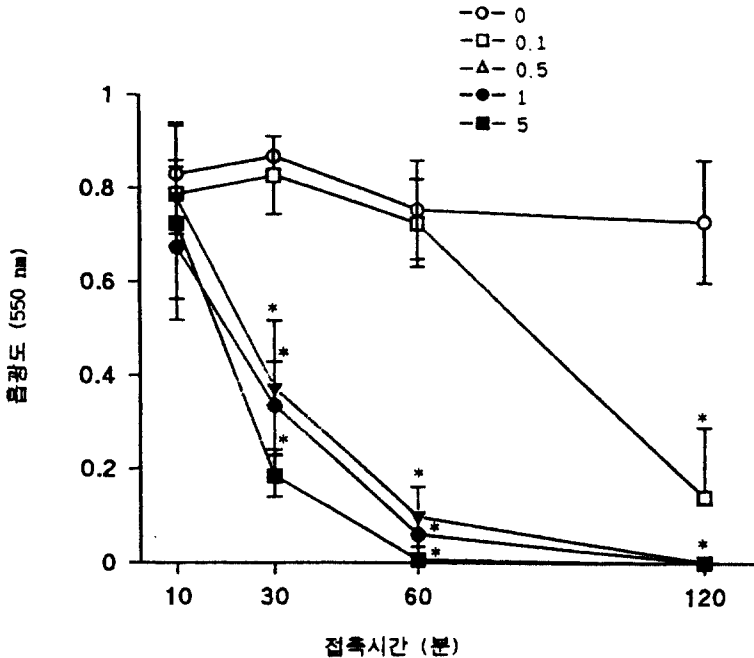


그림 3. 황연, 후박 및 구연산 혼합제재물 (혼합비율 3: 3: 4)의 농도별 접촉시간에 따른 *S. mutans* 항균효과. 혼합제재물 1 ml이 들어있는 1.5 ml tube에 균수가 5×10^7 / ml 되게 *S. mutans*를 접종하고 10 분, 30 분, 60 분 및 120 분간 접촉시킨 후 원심분리하여 균을 세척하였다. 세척한 균에 새 BHI 액체배지 1 ml을 첨가하여 37 °C에서 15 - 16 시간 혐기적으로 배양하였으며, *S. mutans*의 증식정도는 550 nm에서 세균 배양배지의 흡광도를 측정하여 평가하였다. * 혼합제재물을 처리하지 않은 결과와 비교하여 $p < 0.05$ 을 의미한다.

2. 황연 및 후박 혼합제재물의 농도별 *S. mutans* 증식 억제효과

황연, 후박, 구연산 및 축합인산염을 함유한 5 가지 혼합제재물을 만들고 이들 혼합제재물에 대한 *S. mutans* 증식억제 효과를 원판 확산법으로 평가하였다 (표 1, 그림 2). 혼합제재물 1 %, 5 % 및 10 % 에서 세균증식 억제대의 직경은 혼합제재물 1에서는 각각 8.0 ± 0.1 mm, 11.1 ± 0.1 mm, 15.0 ± 0.1 mm로 나타났으며, 혼합제재물 2에서는 13.0 ± 0.1 mm, 18.0 ± 0.1 mm, 22.0 ± 0.1 mm, 혼합제재물 3에서는 10.0 ± 0.1 mm, 16.1 ± 0.1 mm, 18.1 ± 0.1 mm, 혼합제재물 4에서는 8.0 ± 0.1 mm, 11.1 ± 0.1

mm, 12.1 ± 0.1 mm, 혼합제재물 5 에서는 12.0 ± 0.1 mm, 17.1 ± 0.1 mm, 18.1 ± 0.1 mm 로서 5 종의 혼합제재물 모두 1 % 에서 세균증식억제대를 나타내었으며 황연, 후박 및 구연산을 혼합비율이 3: 4: 3되게 혼합한 경우 즉, 혼합제재물 2인 경우 *S. mutans*에 대한 증식 억제효과가 큰 것으로 나타났다.

3. 황연, 후박 및 구연산 혼합제재물 (혼합비율 3: 4: 3)의 농도별 접촉시간에 따른 *S. mutans* 항균효과

황연, 후박 및 구연산 혼합제재물 (혼합비율 3: 4: 3)의 접촉시간에 따른 *S. mutans* 항

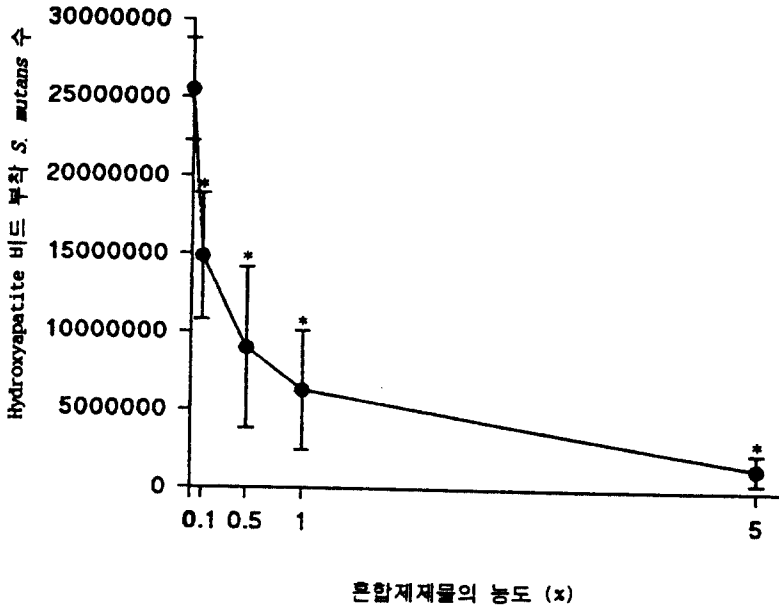


그림 4. 황연, 후박 및 구연산 혼합제제물 (혼합비율 3: 4: 3)의 *S. mutans* 부착 억제효과. HA 비드를 타액으로 처리한 후, 이것에 ^3H -표지한 세균 (2×10^8 cell)과 황연 및 후박 혼합제제물 (0, 0.1 %, 0.5 %, 1 %, 5 %)을 함유한 완충액을 넣고 회전시켜 세균과 비드가 계속 혼합되도록 하였다. 이렇게 하여 세균부착 반응을 유도한 후, 비드를 완충액으로 세척하여 부착하지 않은 세균을 제거하고 세척한 비드의 방사능 (cpm, counter per minute)을 측정하여 HA 비드에 부착된 세균수를 계산하였다.* 혼합제제물을 처리하지 않은 결과와 비교하여 $P < 0.05$ 를 의미한다.

균효과는 혼합제제물과 10 분, 30 분, 60 분 및 120 분 접촉시킨 *S. mutans*를 새 배양배지에서 배양하여 측정하였으며, *S. mutans*의 증식 억제 정도는 배지의 흡광도로 나타내었다 (그림 3). 10분, 30 분, 60 분 및 120 분 접촉시 *S. mutans* 배양배지의 흡광도는 혼합제제물 농도 0.1 % 에서 각각 0.787 ± 0.058 , 0.827 ± 0.083 , 0.725 ± 0.094 , 0.140 ± 0.149 , 0.5 % 에서는 0.781 ± 0.079 , 0.373 ± 0.143 , 0.098 ± 0.064 , 0.002 ± 0.001 , 1 % 에서는 0.674 ± 0.112 , 0.335 ± 0.094 , 0.060 ± 0.047 , 0, 5 % 에서는 0.725 ± 0.208 , 0.184 ± 0.044 , 0.006 ± 0.001 , 0 이었으며, 혼합제제물로 처리하지 않은 대조군에서는 각각 0.830 ± 0.110 , 0.868 ± 0.083 , 0.754 ± 0.106 , $0.729 \pm$

0.131 로서 황연, 후박 및 구연산 혼합제제물 (혼합비율 3: 4: 3)은 0.1 % 농도에서 2시간 접촉시, 0.5 %, 1 % 및 5 % 농도에서 30 분 접촉시 *S. mutans*에 대한 증식을 억제하였다.

4. 황연, 후박 및 구연산 혼합제제물 (혼합비율 3: 4: 3)의 *S. mutans* 부착 억제 효과.

황연, 후박 및 구연산 혼합제제물의 농도에 따른 HA 비드 부착 *S. mutans* 수는 혼합제제물의 농도 0.1 %, 0.5 %, 1 % 및 5 % 에서 각각 $1.485 \times 10^7 \pm 4.035 \times 10^6$, $8.989 \times 10^6 \pm 5.179 \times 10^6$, $6.270 \times 10^6 \pm 3.833 \times 10^6$ 및 $1.485 \times 10^6 \pm 9.790 \times 10^5$ 이며 대조군에서는 $2.511 \times 10^7 \pm 3.273$

$\times 10^6$ 으로서 0.1 % 혼합제제물로 처리한 경우 HA에 부착된 *S. mutans* 수가 감소하였으며 혼합제제물의 농도가 증가 함에 따라 HA 비드 부착세균수도 점차적으로 감소하였다(그림 4).

IV. 고 찰

본 연구에서 사용한 후박은 목련과 나무로 약재로 쓸때는 껍질을 말려서 사용하며, 소화 촉진 및 소염 작용이 있는 것으로 기록되어 있으며, 미나리제비과에 속한 다년생 초본의 뿌리를 건조한 황연도 위염, 장염 및 소화불량에 효능이 있어 한약재로 사용되고 있다²³⁾. 본 실험에서 항우식 물질을 얻고자 황연의 뿌리 및 후박의 수피로부터 추출물을 얻어 이들의 *S. mutans*에 대한 항균효과를 평가하였다. 그결과 황연 및 후박 추출물 모두 *S. mutans*의 증식을 억제하는 것으로 나타나 (그림 1) 황연 및 후박 추출물에 의한 *S. mutans*의 항균작용을 확인할 수 있었다. 이상적인 항우식제는 무독성, 낮은 내성 균주 발현 빈도, 안정성, 신속한 항균효과, 오랜 지속 시간등과 같은 특성 이외에 좋은 미각을 지녀야 한다. 이러한 점에서 황연 및 후박 추출물은 항균효과는 강하나 고미성분이 함유되어 있어 쓴맛이 느껴진다는 단점이 있어 이들을 단독으로 사용하기에는 어려운 점이 있다. 그러므로 본 연구팀은 황연 및 후박 추출물에 고미가 느껴지지 않으며 항균 효과가 있는 것으로 알려진 구연산 및 축합인산염을 여러 농도로 첨가하여 쓴맛이 느껴지지 않은 5종의 혼합제제물을 제조한 후 (표 1) 이들 혼합제제물의 *S. mutans*에 대한 항균효과를 평가하였다. 그 결과 황연, 후박 및 구연산이 3: 4: 3의 비율로 함유된 혼합제제물인 경우, 항균효과가 가장 우수한 것으로 나타나 황연, 후박 및 구연산이 3: 4: 3의 비율로 혼합된 혼합제제물을 선택하여 본 혼합제제물의 항우식제로서의 사용 가능성을 평가하였다 (그림 2). 구강내는 항상 타액이 분비되므로 가능한 한 짧은 접촉시

간 후 항균효과를 나타내는 것이 중요하다. 황연, 후박 및 구연산 혼합제제물 (혼합비율 3: 4: 3)의 접촉시간에 따른 *S. mutans* 성장 억제효과는 혼합제제물 0.1 % 농도에서는 2 시간 접촉시 나타나기 시작하였으며, 0.5 % 이상의 농도에서는 30분간 접촉시 *S. mutans*의 성장을 억제하기 시작하여 1 시간 정도에서는 저해율이 70 % 이었다. 이는 구강내에서 선택된 혼합제제물의 항우식효과를 기대하기 위해서는 최소한 0.5 % 이상의 농도에서 30분간 이 물질이 구강에 잔류할 수 있도록 해주어야함을 시사해준다(그림 3). 치아우식의 주 원인균인 *S. mutans*는 치면 부착, 증식 및 산생성 과정을 거쳐 치아우식을 유발하므로 *S. mutans*가 치아우식을 유발하기 위해서는 우선 치면에 부착 해야한다. 일반적으로 세균의 치면 부착 정도를 정량적으로 분석하기 위해서는 치질의 구성성분인 HA 비드를 사용한다^{24,25,26)}. 즉 동위원소로 표지화한 *S. mutans* 균액과 타액으로도 또한 HA비드를 혼합한 용액에 혼합제제물을 첨가하여 HA 비드의 방사능을 측정하여 비드에 부착한 세균수를 계산한다. 본 연구에서도 황연, 후박 및 구연산 혼합제제물이 *S. mutans*의 HA 비드에 부착에 미치는 영향을 평가하여 선택된 혼합제제물에 의한 *S. mutans*의 치면부착 억제효과를 확인하였다. 혼합제제물 0.1 %, 0.5 %, 1 % 및 5 %로 처리한 경우 세균 부착 저해율은 각각 42 %, 65 %, 75 % 및 94 %로서 저농도 (0.1 %)에서도 50 % 정도 세균의 부착을 억제할 수 있으며 5 %에서는 거의 완전히 세균의 부착을 억제할 수 있음을 확인할 수 있었다 (그림 4). 즉 이러한 결과들은 황연, 후박 및 구연산 혼합제제물 (혼합비율 3: 4: 3)이 0.5 % 이상의 농도에서 *S. mutans* 성장뿐만 아니라 부착도 억제할 수 있음을 시사해준다. 일반적으로 항우식제는 치아우식을 예방할 목적으로 구강위생제인 치약, 구강세척제 및 껌의 일부 성분으로 많이 이용되므로 황연, 후박 및 구연산 혼합제제물도 이들 구강위생제의 성분으로 첨가할 수 있을 것으로 본다.

현재까지 항우식효과가 있는 것으로 알려진 물질에는 여러 종류가 있으나 작용기전은 서로 다른 것으로 보고되었다. 즉, 오통차 및 녹차는 polyphenol 성분이 *S. mutans*의 glucosyltransferase에 의한 glucan 생성을 억제하여 치아우식을 예방하는 것으로²⁷⁾, 불소는 세균의 enolase에 의한 당분해과정을 억제하여^{28,29)} 항우식효과를 나타내는 것으로 알려졌다. 본 실험에서 *S. mutans*에 대한 항균효과 있는 것으로 나타난 황연은 berberine, palnitine, coptisine 등이, 또한 후박은 magnolol등이 주성분이며²³⁾ 이들 성분 중 berberine 과 Magnolol이 세균의 정상적인 발육을 억제하는 것으로 보고되어 있으므로³⁰⁾ 황연 및 후박 추출물에 의한 *S. mutans*의 항균효과는 berberine 및 Magnolol에 의한 것으로 생각된다. 항우식제를 구강에 적용하기 위해서는 항우식제가 정상조직에 해를 주어서는 안된다. 황연 및 후박은 이미 약재의 성분으로 이용되고 있으며, 대한 약전의 생약 규격집에는 독성이 없는 것으로 기록되어 있으므로²³⁾ 구강에서도 안전하게 사용될 수 있을 것으로 본다. 지금까지의 결과를 종합하여 볼 때 황연, 후박 및 구연산 혼합제재물은 3: 4: 3 으로 혼합한 경우 고미도 느껴지지 않으며, 저농도에서 치아우식의 원인균 *S. mutans*의 치면 부착 및 증식을 억제하므로 항우식 물질로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Hamada S, Koga T, Ooshima T: Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. J Dent Res 1984; 63: 407-411.
2. Gibbons RJ, van Houte J: Bacterial adherence in oral microbial ecology. Annu Rev Microbiol 197; 529: 19-44.
3. McGhee JR, Michalek SM: Immunobiology of dental caries:

Microbial aspects and local immunity, Ann Rev Microbiol 1981; 135: 595-635.

4. Ismail AI, Brodeur JM, Kanvanagh M, Boisclair G, Tessier C, Picotte L: Prevalence of dental caries and dental fluorosis in students. 11-17 years of age, in fluoridated and non-fluoridated cities in Quebec. Caries Res 1990; 24: 290-297 .
5. Riordan JJ: Dental fluorosis, Dental caries and fluoride exposure among 7-year-olds. Caries Res 1993; 27: 71-77.
6. Konig KG: Role of Fluoride tooth pastes in a caries-preventive strategy. Caries Res 1993;27 (Suppl 1):23-28.
7. Brunelle JA: The prevalence of dental fluorosis in US children, 1987 [abstract]. J Den Res 1989; 68:995.
8. Hamada ST, Horkoshi T, Minami S, Kawabata S, Hiraoka J, Fujiwara J, Ooshima T: Oral passive immunization against dental caries in rats by use of hen egg yolk antibodies specific for cell-associated glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*. Infect Immun 1991; 59: 4161-4167.
9. Smith DJ, Taubman MA, Ebersole JL: Effects of local immunization with glucosyltransferase on colonization hamsters by *Streptococcus mutans*. Infect Immun 1982; 37: 656-661.
10. Taubman MA, Smith DJ: Effects of local immunization with glucosyltransferase fractions from *Streptococcus mutans* on dental caries in rats and hamsters. J Immunol 1977; 118: 710-720.
11. McGhee JR, Michalek SM, Webb J, Navia JM, Rahman AFR, Legler DW: Effective immunity to dental caries. Protection of gnotobiotic rats by local and immunization with *Streptococcus mutans*. J Immunol 1975; 114: 300-305.
12. Ferretti JJ, Shea C, Humphery MW:

- Cross-reactivity of *Streptococcus mutans* and human heart tissue. Infect Immun 1980; 30: 69-73.
13. Hughes M, MacHardy SM, Sheppard AJ, Woods NC: Evidence for an immunological relationship between *Streptococcus mutans* and human cardiac tissue. Infect Immun 1980; 27: 576-588.
 14. van de Rijn I, Bleiweis AS, Zabriskie JB: Antigens in *Streptococcus mutans* cross reactive with human heart muscle. J Dent Res 1976; 55: C59-64.
 15. Wu-Yuan CD: Gallotannins inhibit growth, water-insoluble glucan synthesis and aggregation of mutans Streptococci. J Dent Res 1988; 67:51-55.
 16. Wu-Yaun CD: In vitro screening of Chinese medical toothpastes: Their effects on growth and plaque formation of Mutans streptococci. Caries Res 1990; 24: 198-202.
 17. 강 성 호 : 수종의 차 음료가 *Streptococcus mutans*의 성장에 미치는 영향에 관한 연구. 대한 구강보건학회지 1990; 14: 137-146.
 18. Sakanaka SM, Kim M, Taniguchi M, Yamamoto T: Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a carcinogenic bacterium. Agric Biol Chem 1989; 83: 2307-2311.
 19. Kubo I, Muroi H, Himejima M: Antimicrobial activity of green tea flavor components and their combination effects. J Agric Food Chem 1992; 40: 245-248.
 20. Nakahara K, Kawabata S, Ono H, Ogura K, Tanaka T, Ooshima T, Hamada S: Inhibitory effect of Oolong tea polyphenols on glucosyltransferase of mutans streptococci. Appl Environ Microbiol 1993; 59: 968-973.
 21. Ooshima T, Minami T, Aono W, Izumitani A, Sobue S, Fujiwara T, Kawabata S, Hamada S: Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries by rats infected with Mutans Streptococci. 1998; 27: 124-129.
 22. Shon WS, Yoo YC, Kim CY: The effect of NaCl and Bamboo salt on the growth of various oral bacteria. J Korean Academy of Dental health 1991; 15: 252-265.
 23. 지형준, 이상인: 대한약전의 생약 규격 집, 1988; 한국 medical index 사.
 24. Rosan EB, Vincet B: Optimization of an hydroxyapatite adhesion assay for *Streptococcus sanguis*. Infect Immun 1984; 44: 287.
 25. KIm KY, KIM KK, Choe SJ: A study on adherence of oral streptococci to hydroxyapatite bead. J Oral Biol. 1988; 12: 109-116.
 26. Shin HK, Lee SY, CHoe SJ: A study on adhesion of oral streptococci to protein-coated hydroxyapatite bead. J Oral Biol 1988; 12:99-108.
 27. Otaka S, Makimura M, Kuroki T, Nishihara Y, Hirasawa M: Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea 1991; 25: 438-443.
 28. Hamilton IR: Effects of fluoride on enzymatic regulation of bacterial carbohydrate metabolism. Caries Res 1977; 11: 262-291.
 29. Hamilton IR: Biochemical effect of fluoride on oral bacteria. J Dent Res 1990; 69 (Spec Iss): 660-667.
 30. Namba T, Tsunozuka M, Bae KH, Hattori M: Studies on dental caries prevention by traditional chinese medicines (Part I) screening of crude drugs for antibacterial action against *Streptococcus mutans*. 생약 학잡지 1991; 35: 295-302.

- ABSTRACT -

Inhibitory Effect of a mixture of Coptidis Rhizoma, Magnoliae Cortex and citric acid on growth and adherence of *Streptococcus mutans* to hydroxyapatite bead

Yu Yun-Jung · Park Yong-Seok^{***} · Kwak Wall-Ah · Yun Jun-Ho^{*}

Min Youn-Sook · Kwon Ho-Kwen^{**} · Lee Syng-Il

Dept. of Oral Biology, College of Dentistry^{}, Dept. of Preventive Dentistry^{**}, College of Dentistry, Yonsei University, Dept. of Fundamental Research, R&D Center, HAITAI Confectionary Co.^{***}*

Key words: A mixture of Coptidis Rhizoma, Magnoliae Cortex and citric acid, Streptococcus mutans, Anticariogenic agent.

Streptococcus mutans is an etiologic agent of dental caries and has been known to induce dental caries by the process of initial attachment, proliferation and acid production. For the prevention of dental caries which is caused by this process, extracts of natural products have recently been introduced. To investigate the possibility of using Coptidis Rhizoma and Magnoliae cortex which are natural products as anticariogenic agents, we isolated extracts from Coptidis Rhizoma and Magnoliae Cortex and investigated the inhibitory effect of these extracts on growth of *S. mutans* using agar diffusion method. And we made several mixtures of Coptidis Rhizoma, Magnoliae Cortex, citric acid and metaphosphate to reduce a bitter taste of Coptidis Rhizoma and Magnoliae Cortex and investigated as follows. After we selected a mixture which had high growth inhibitory activity against *S.*

mutans by agar diffusion method, we examined the effect of the selected mixture on the attachment of *S. mutans* to hydroxyapatite beads and on the growth of *S. mutans* according to exposure time. A mixture of Coptidis Rhizoma, Magnoliae Cortex and citric acid which combined at 3: 4: 3 ratio presented wide growth inhibitory zone of *S. mutans* and inhibited the attachment of *S. mutans* to hydroxyapatite beads at 0.1 % concentration. 0.1 % mixture inhibited growth of *S. mutans* after 2 hour exposure and 0.5 % mixture inhibited growth of *S. mutans* after 30 minute exposure. In conclusion, a mixture of Coptidis Rhizoma, Magnoliae Cortex and citric acid turned out to be an effective anticariogenic agent because this mixture inhibited not only growth but also attachment of *S. mutans* which is the etiologic agent of dental caries.